第4卷第4期
1983年11月
动物学研究
ZOOLOGICAL RESEARCH
Vol. 4, No. 4
Nov., 1983

前环藻(*Amphidinium carterae*)(涡鞭毛虫)染色质碱性蛋白的研究

陈云鹤　周瑶良　苟世康　乔以炯*　李靖炎

(中国科学院昆明动物研究所)

摘　要

本研究用甲醇固定、细胞匀浆、0.3*N*HCl 抽提及丙酮沉降的四步法提取了属于典型涡鞭毛虫类的前环藻(*Amphidinium carterae*)之染色质碱性蛋白及作为对照的小牛胸腺组蛋白,并以酸尿素系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳,对所提取的蛋白作了对比检查。结果小牛胸腺的总组蛋白被分离成H1、H3、H2A、H2B及H4五条电泳带;前环藻的蛋白样品在组蛋白电泳区唯一出现了一条电泳带,其电泳迁移率相当于小牛胸腺组蛋白H4。根据本结果和另外一些作者对其他一些涡鞭毛虫类的生化和细胞化学研究的结果,表明以往主要根据经典的细胞化学研究之结果而认为涡鞭毛虫类的细胞核或染色体不含组蛋白或碱性蛋白作为其一重要特征,是并不全面和可靠的。包括本研究在内的几个生化研究结果也暗示了涡鞭毛虫类的染色质主要含一种电泳迁移率类似于组蛋白H4的碱性蛋白可能是一普遍现象。

前　言

涡鞭毛虫类(Dinoflagellate)是从原核生物进化到高等真核生物的一群过渡类型的单细胞生物(Allen等,1975;Hamkalo等,1977)。它们虽属于低等真核生物,但其细胞核及染色质的结构与功能却近似于原核生物(李靖炎,1979)。一般认为涡鞭毛虫类与典型的真核生物之间的区别主要在于前者在整个细胞周期中始终地保持着致密的染色体结构(Dodge, 1964; 1966; Soyer 1971; Allen等, 1975);其次,许多研究指出前者的染色体不含组蛋白或碱性蛋白(Ris, 1962; Dodge, 1964; 1966; 1971; 1973; Soyer, 1971; Kubai和Ris, 1969)。虽然早些时候人们已认识到这群生物是研究真核细胞生物进化起源的活化石,但由于研究的深度及广度有限,且又偏重于形态结构方面的分析研究

* 中国科学院上海细胞生物学研究所
本文1982年11月13日收到。

工作，因而进展较为缓慢，关于细胞核的化学组成方面的研究，主要限于细胞化学方面进行。因此，作为上述涡鞭毛虫类生物的两个最突出的特点之一，大部分是以细胞化学方法研究为基础的。1972年以来，主要由 Rizzo 和 Noodén（1972；1973；1974a, b；1977）进行了一些生物化学的研究工作，但只限于两三个种的涡鞭毛虫上进行。近来在国内孙毓麟等（1978）进行了一些生化研究工作，但也只限于对一个种上进行，由于就涡鞭毛虫类本身，就有可能存在着不相同的进化阶梯，因此结合细胞化学和生物化学二者方法，广泛而深入地进一步研究其进化问题是很必要的。

本研究应用微量提取染色质碱性蛋白的方法（陈云鹤等，待发表），提取了属典型涡鞭毛虫类生物的前环藻（*Amphidinium carterae*）之染色质碱性蛋白，并以微量或半微量的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳作了定性检查。

材料与方法

（一）前环藻（*Amphidinium carterae*）：海生，营自养生活。（藻种由上海细胞生物研究所所长庄孝僡教授从美国带回）。培养液用厄氏（Erdschreiber）培养基，每100毫升中另补加了2毫升土壤浸出液及0.2毫升复合维生素混合液。培养液经过滤消毒后，于100毫升锥形瓶中加入50毫升培养液，接种上10毫升种子液，置背阳光的房间内培养。在距离培养瓶20厘米高处装配一管40瓦日光灯，与自然散射光一起每日照明10小时。平均室温约22°C（16—26°C）。培养一周时藻浓度一般约达70万个细胞/毫升。镜检培养物时，纯为前环藻，未发现污染。

（二）染色质碱性蛋白的提取：前环藻以及作为对照的小牛胸腺染色质碱性蛋白，分如下四步提取：（1）取培养一周的前环藻液100毫升，在1600 g 下离心10分钟，弃去上层液立即用甲醇（分析纯）固定藻细胞沉淀。固定时间在2小时以上，约每半小时换一次甲醇，以除去溶于甲醇中的叶绿素等色素。固定和脱色充分后，再用纯甲醇洗二次（于1600 g 下每次离心5分钟）。（2）以上所得的藻细胞沉淀移入一个容量约1毫升的玻璃匀浆器内，直接匀浆破细胞（于冰浴中），匀浆3—5分钟后，约0.1毫升体积的匀浆物加上2倍体积的0.3 N HCl，抽提染色质碱性蛋白（仍在冰浴中进行）。20分钟后在2600 g 下离心10分钟，取上清液贮放于一离心管中，沉淀部分重复匀浆并以0.3 N HCl抽提2次。（3）三次离心所得上清液汇集一起，加入8体积丙酮以沉淀酸溶性蛋白。在1600 g 下离心10分钟收集蛋白，并重复用丙酮洗二次（有时进一步用无水乙醇及乙醚各洗二次）后，真空干燥备用。

作对照的小牛胸腺总组蛋白的提取用0.1克量的材料，同样按上述方法进行。

（三）染色质碱性蛋白的电泳鉴定：丙烯酰胺凝胶电泳系统基本参照 Panyim 和 Chalkley（1969）的方法。但我们以微量或半微量电泳进行，且作了一些改良，如丙烯酰胺与双丙烯酰胺之比改为60：0.8；0.2%的过硫酸铵液用时每毫升中加入2% Tritonx-100 0.1毫升混合后使用。丙烯酰胺凝胶浓度为15%，凝胶管用内经0.6毫米、长4厘米的玻璃管。样品液含8 M 尿素、40%蔗糖、0.1%巯基乙醇。蛋白浓度为3毫克/毫升，加样量为0.05微升/管（0.15微克）。电极缓冲液用2.5 M 尿素，0.4 M 甘氨酸，0.9 N 冰醋

酸（PH3）。电泳先用25 V 5分钟，然后70 V（0.11*mA*/管）25分钟。凝胶用中性的偶氮洋红G及氨基黑10 B分别染色观察结果。

结 果 与 讨 论

应用甲醇固定、细胞匀浆、0.3*N*HCl抽提及丙酮沉淀的四步法，分别提取前环藻及小牛胸腺总组蛋白样品，通过酸尿素系统的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳作定性检查，结果得到了如图1所示的电泳图型。小牛胸腺总组蛋白被分离成H1、H3、H2A、H2B及H4五条带；前环藻的蛋白样品，仅出现一条单独的电泳带，这条蛋白带与同时电泳的小牛胸腺总组蛋白和单独的组蛋白H4的带子比较，其电泳迁移率正相当于组蛋白H4。因偶氮洋红G在细胞化学研究中，具有专特地显示染色质碱性蛋白的特点。（李靖炎，1964）而用中性的偶氮洋红G液（0.05%）染电泳凝胶时，小牛胸腺总组蛋白、组蛋白H4和前环藻单独出现的这条蛋白带皆一致地染成红色。由此证明：前环藻的染色质含有一种碱性蛋白，且其电泳迁移率相当于小牛胸腺组蛋白的H4，这一碱性蛋白是否与小牛胸腺组蛋白H4等同或有何差异，则尚待对其氨基酸组成及免疫学性质的分析。

Giesbrecht（1962）曾指出前环藻（*Amphidinium carterae*）的染色体与细菌的染色质体之间的超微结构是相似的，最近Oakley和Dadge（1979）也指出这种观点被各种涡鞭毛虫类确实无染色体碱性蛋白的事实所支持。因此按照以往细胞化学研究的观点，像这样典型的涡鞭毛虫类是不会存在染色质碱性蛋白的。但是我们用生化方法检查的结果表明，前环藻事实上含有一种电泳迁移率相当于组蛋白H4的染色质碱性蛋白。在此以前，Rizzo和Noodén（1972；1974 a，b）的生化研究工作也曾发现属于涡鞭毛虫类的曲沟藻（*Gyrodinium Cohnii*）及转轴多甲藻（*peridinium trochoideum*）都有一种染色质碱性蛋白，其电泳迁移率近似组蛋白H4，但分子量大于H4。他们还在一种双核的多甲藻（*Peridinium balticum*）中发现了与小牛胸腺组蛋白除H3以外的四种组蛋白电泳迁移率相当的碱性蛋白，认为这是称之为“真核”的一个核中所具有的。而认为典型的涡鞭毛虫的那个核则仅具有一种近似组蛋白H4电泳迁移率的染色质碱性蛋白。Ris和Kubai(1974）用通常的细胞化学方法研究发现，在涡鞭毛虫类中在进化上较高等的合沟虫（*Syndinium*）的染色体是含有碱性蛋白的。李靖炎等(1978)用细胞化学方法，孙毓麟等(1978）用生化方法同样发现核结构稍高等的涡鞭毛虫类尖尾藻（*Oxyrrhis marina*）染色体有碱性蛋白，是一种近似组蛋白H4电泳迁移率的碱性蛋白，随后李靖炎等（1979、1980)用不同于以往常用的细胞化学方法，即不除去染色体DNA的氨银染色法显示碱性蛋白，结果发现所检查的四种典型的涡鞭毛虫都含有染色质碱性蛋白，根据以上这些结果，显然表明不论是典型的涡鞭毛虫类还是进化稍高等的涡鞭毛虫类，实际上是含有染色质碱性蛋白的。因而把涡鞭毛虫类不含组蛋白或染色质碱性蛋白作为其一个重要特征是不够全面和可靠的。

现在已知高等真核生物的染色质纤维的亚单位结构是五种组蛋白和DNA结合形成念珠状结构的复合体（Karnberg，1974），那么仅含一种电泳迁移率与组蛋白H4相当的染色质碱性蛋白的涡鞭毛虫类，是否会存在一种原始类型的核小体结构，还待研究证实。

参 考 文 献

李靖炎 1964 中国动物学会三十周年学术讨论会论文摘要汇编，第三分册，407页，科学出版社。

李靖炎、陈向虹、乔以娴 1978 实验生物学报11:303—307。

孙毓麟、范佩芳、商伟明 1978 实验生物学报11:297—302。

李靖炎 1979 细胞在生命进化历史中的发生——真核细胞的起源，40—41，科学出版社。

李靖炎、乔以娴 1979 实验生物学报12:123—129。

李靖炎、乔以娴、商伟明 1980 中国细胞生物学会成立大会论文摘要汇编、69—70页。

李靖炎 1981 实验生物学报14:249—257。

Allen, J. R., Roberts, T. M., Loeblieh, A.R. Ⅱ, Klots, L. C. 1957 Characterization of the DNA from the dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii* and implications for nuclear organization. *Cell* 6:161—169.

Dodge, J. D. 1964 Chromosome structure in the dinophyceae. Ⅱ. Cytochemical study. *Arch. Microbiol.* 48:66—80.

Dodge, J. D. 1966 The dinophyceae. in *The Chromosomes of the Algae*. pp. 96—115, (Ed. M.B. E. Godward), Arnold, London.

Dodge, J. D. 1971a A dinoflagellate, with both mesocaryotic and aeucaryotic nucleus. Protoplasma 73:145—157.

Dodge, J. D. 1973 The fine structure of algae cell. pp. 143—146. Academic Press, London. New York.

Giesbrecht, P. 1962 Vergleichende untersuchungen an der chromosomen Des dinoflagellaten *Amphidinium elegansund* denen der bakterien. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 187:452—498.

Hamkalo, B. A., Battner, J. B. 1977 The structure of a mesokaryote chromosome. *Chromosoma* 60:39—47.

Korhberg, R. D. 1974 Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868—871.

Kubai, D. F., Ris, H. 1969 Division in dinoflagellate Gyrodinium Sc. A new type of nuclear reproduction. *J Cell Biol.* 40:508—528.

Oakley, B. R., Dodge, J. D. 1979 Evidence for a double-helically coiled toroidal chromonema in the dinoflagellate chromosome. *Chromosoma* 70:277—291.

Panyim, S., Chalkey, R. 1969 High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 130:336—347.

Ris, H. 1962 Interpretation of Ultrastructure (R. I. Harris, ed). pp. 69—87. New York and London, Academic Press.

Ris, H., Kubai, D. 1974 An unusual mitotic mechanism in the parasitic protozoan *Syndinium sp.* *J. Cell Biol.* 60:702—720.

Rizzo, P. J., Nooden, L. D. 1972 Chromosomal proteins in the dinoflagellate algae *Gyrodinium cohnii*. *Science* 176:796—797.

Rizzo, P. J., Nooden, L. D. 1973 Isolation and chemical composition of dinoflagellate nuclei. *J. Protozol.* 20:666—672.

Rizzo, P. J, Nooden, L. D. 1974 Isolation and partial characterization of dinoflagellate chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 349:402—414.

Rizzo, P. J., Nooden, L. D. 1974 Partial characterization of dinoflagllate chromosomal proteins *Biochim. Biophys. Acta* 349:415—427.

Rizzo, P. J., Nooden. L. D. 1977 Histone occurrence in chromatin from *Peridinium balticum*, a binucleate dinoflagellate. *Science* 198:1258—1260,

Soyer, M-O. 1971 Structure du noyau des Blastodinium (dinoflagellate parasites): division et condensation chromatique. *Chromosoma* 33:70—114.

Stewart, J. M., Bech, J. S. 1967 Distribution of the DNA and the DNA-histones in the nuclei of free-living and parasitic sarcomastigophora. *J. Protozool.* 14:2225—2231.

Tippit, D. H., Pickett-Heaps, J. D. 1976 Apparent amitosis in the binucleate dinoflagellate *Peridinium balticum*. *J. Cell Sci.* 21:273—289.

BIOCHEMICAL STUDY OF CHROMOSOMAL BASIC PROTEIN FROM THE DINOFLAGELLATE *AMPHYDINIUM CARTERAE*

Chen Yunhe, Zhou Xingliang, Gou Shikang, Li Jingyan
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Qiao Yijiong

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica)

We examined the chromosomal basic protein from the Dinoflagellate *Amphidinium carterae*. The chromosomal basic protein of *A. carterae* and calf thymus histones as control were isolated by four steps: methanol-fixation, cell-homogenization, 0.3N HCl-extraction and acetone-sedimentation. The qualitative examination of the isolated proteins was made in acid urea polyacrylamide gel electrophoretic system. As a result, the histones from calf thymus were separated into five bands: Hl, H3, H2A, H2B and H4, and no other protein bands were observed. The extracted protein from *A. carterae* showed only one single band. Its electrophoretic mobility was similar to that of calf thymus histone H4. This result together with those of other authors on biochemical and cytochemical studies all indicates that the chromosomes of dinoflagellate contain chromosomal basic protein. The opinion that the lack of chromosomal basic proteins is an important character of dinoflagellate seems to be incorrect.